

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ :

C12N 15/10, C07H 1/08, B01D 21/26

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/30685

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

16. Juli 1998 (16.07.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00103

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Januar 1998 (09.01.98)

(30) Prioritätsdaten:

97100331.4 10. Januar 1997 (10.01.97) EP

(34) Länder für die die regionale oder
internationale Anmeldung eingereicht
worden ist: DE usw.(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer
Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUHNE, Wolfgang
[DE/DE]; Wolfbauerweg 10, D-82377 Penzberg (DE).(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,
D-81679 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,
GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.(54) Title: PURIFICATION AND/OR CONCENTRATION OF DNA BY CROSS-FLOW FILTRATION, SEPARATION OF ENDO-
TOXINS FROM A NUCLEIC ACID PREPARATION(54) Bezeichnung: REINIGUNG ODER/UND KONZENTRIERUNG VON DNA DURCH CROSS-FLOW-FILTRATION, ABTREN-
NUNG VON ENDOTOXINEN AUS EINER NUCLEINSÄURE-PRÄPARATION

(57) Abstract

The invention concerns a method of purifying and/or concentrating nucleic acids in a solution, the solution containing nucleic acid being guided tangentially past one or a plurality of semipermeable membranes, such that the nucleic acid molecules are retained by the membranes and substances having a lower molecular weight can pass through the membranes and/or be adsorbed thereat, so that a purified and/or concentrated nucleic acid solution is obtained. The same method is carried out to separate endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention further concerns the use of a cross-flow filtration system for purifying and/or concentrating nucleic acids in a solution and for separating endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention also concerns the use of the nucleic acids purified and/or concentrated by the cross-flow filtration system for cloning, transformation, transfection and microinjection into cells, for use in gene therapy processes, DNA vaccination and/or for polymerase chain reaction (PCR).

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung, wobei man die Nucleinsäure enthaltende Lösung tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeileitet, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können oder/und an der Membran adsorbiert werden und man eine gereinigte oder/und konzentrierte Nucleinsäure-Lösung erhält. In derselben Weise wird zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation verfahren. Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung sowie zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation. Ferner die Verwendung der mit der Cross-Flow-Filtration gereinigten oder/und konzentrierten Nucleinsäuren zum Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Gentherapie, der DNA-Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

REINIGUNG ODER/UND KONZENTRIERUNG VON DNA DURCH CROSS-FLOW-FILTRATION, ABTREN-
NUNG VON ENDOTOXINEN AUS EINER NUCLEINSÄURE-PRÄPARATION

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung
oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung,
ein Verfahren zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer
Nucleinsäure-Präparation sowie die Verwendung einer Cross-
10 Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung oder/und zur Konzentrie-
rung von Nucleinsäuren in einer Lösung und zur Abtrennung von
Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation.

Im Bereich der Molekularbiologie sind Nucleinsäure-Aufreini-
15 gungsverfahren gebräuchliche Methoden. In aus dem Stand der
Technik bekannten Verfahren wird z. B. das gewonnene biolo-
gische Material, beispielsweise E.coli Bakterienzellen, nach
dessen Aufschluß (üblicherweise Lyse mit Lysozym oder Ultra-
schall) abzentrifugiert und der Überstand wird mit Phenol
20 ausgeschüttelt. Anschließend wird an einem Cäsiumchlorid-Gra-
dienten eine Ultrazentrifugation durchgeführt (Birnboim &
Doly, Nucl. Acid Res. 7 (1979) 1513 - 1523, Garger et al.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 117 (1983) 835-842). Derartige
Präparationen enthalten jedoch im allgemeinen als Verunreini-
25 gungen bakterielle Endotoxine, Phenol, Cäsiumchlorid und/oder
Ethidiumbromid.

Endotoxine sind Bakterientoxine, die bei allen Enterobacteria-
ceae, z. B. Salmonella, Shigella und E.coli zu finden sind. In
30 Säugern wirken Endotoxine als Pyrogen und rufen neben Fieber
zahlreiche weitere pathologische Wirkungen hervor. Für die to-
xische Wirkung der Endotoxine ist insbesondere der Bestandteil
Lipid A verantwortlich.

35 Ein anderes Verfahren zur Aufreinigung von Nucleinsäuren ist
im QIAGEN® Plasmid-Handbook (Qiagen Inc., Chatsworth, USA) und
der EP-B 0 268 946 beschrieben. Danach wird das nach üblichem

Aufschluß gewonnene Zell-Lysat an QIAGEN®-TIP, welches QIAGEN® resin (ein Trägermaterial auf Silicagelbasis) enthält, chromatographiert. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß DNA-Bindeproteine nicht vollständig von der DNA abgelöst werden, so daß die erhaltene Plasmid-Präparation Proteine und insbesondere Endotoxine (z. B. aus der Membran der E.coli-Zelle) in beträchtlichem Umfang enthält.

In einem weiteren Nucleinsäure-Aufreinigungsverfahren wird nach alkalischer Lyse des biologischen Materials, beispielsweise E.coli-Zellen, nach Birnboim & Doly eine Chromatographie des Zentrifugationsüberstandes, unter Hochsalzbedingungen über Anionentauschersäulen (z. B. Mono-Q, Source-Q von Pharmacia, Macroprep-Q von Biorad, Poros-Q von Perspektive Biosystems oder HyperD-Q von Biosepra, vgl. Chandra et al., Analyt. Biochem. 203 (1992) 169-172; Dion et al., J. Chrom. 535 (1990) 127-147) durchgeführt. Auch nach diesem Reinigungsschritt enthält die Plasmid-Präparation noch Verunreinigungen wie Proteine und insbesondere in beträchtlichem Umfang Endotoxine.

In noch einem weiteren Verfahren zur Aufreinigung von Nucleinsäuren wird nach alkalischer Lyse und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion eine Chromatographie über Gelfiltration durchgeführt (McClung & Gonzales, Analyt. Biochem. 177 (1989) 378-382; Raymond et al., Analyt. Biochem. 173 (1988) 124-133). Auch dieses Reinigungsverfahren kann die Verunreinigungen nicht vollständig aus der Plasmid-Präparation entfernen.

Den genannten Aufreinigungsmethoden ist ein abschließender Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt gemeinsam. Üblicherweise wird dabei eine Isopropanol/Ethanol-Fällung der Nucleinsäure mit anschließender Zentrifugation und Resuspension des Nucleinsäure Pellets in Puffer angewendet (vgl. z. B. Sambrook J. et al. (1989), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press). Hierbei wird beispielsweise eine DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 4 M LiCl und anschließend mit 0,7 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur

versetzt. Anschließend wird der sich bildende Niederschlag der Nucleinsäure abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet, das die Nucleinsäure enthält, wird in einem folgenden Schritt in 70%igem Ethanol aufgenommen, nochmals zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und nach Trocknung des Pellets wird dieses in einem gewünschten Puffer resuspendiert. Die Isopropanol/Ethanol-Fällungsmethode ist jedoch nur für Anwendungen im Labor praktikabel, wo mit relativ kleinen Volumina gearbeitet wird.

10

Abgesehen von der Beschränkung auf kleine Volumina hat die beschriebene Isopropanol/Ethanol-Fällungsmethode noch weitere erhebliche Nachteile. So ist es aus Gründen der Betriebssicherheit und des Umweltschutzes sehr ungünstig, die im industriellen Prozeßmaßstab nötigen Isopropanol/Ethanol-Volumina zu verwenden. Außerdem erfüllt die Isopropanol/Ethanol-Fällungsmethode nicht die technischen Voraussetzungen, um therapeutisch verwendbare Nukleinsäuren bereitzustellen, da in der Nucleinsäure-Lösung enthaltene Endotoxine mit dieser Methode nicht vollständig entfernt werden können.

In der WO 95/21177 wird ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren für den Einsatz in der Gentherapie beschrieben, wobei die Reinigung im wesentlichen durch Zentrifugieren, Filtrieren, eine Affinitätschromatographie oder eine Chromatographie an einem anorganischen Chromatographiematerial und eine Chromatographie an einem Ionenaustauscher erfolgt. Zur Abreicherung von Endotoxinen wird die Nucleinsäure mit einem "Endotoxin Removal Buffer", der 10 % Triton® X 100 und 40 mmol/l MOPS-Puffer (3-Morpholino-1-Propansulfonat) enthält, behandelt. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die auf diese Weise gereinigte Nucleinsäure Verunreinigungen der pharmakologisch nicht unbedenklichen Substanzen Triton® und MOPS enthält. Außerdem kann zwar eine Abreicherung von Endotoxinen auf einen Gehalt von ca. 100 EU/mg DNA erreicht werden (QIAGEN News 1-96, 3-5), eine weitergehende Entfernung von Endotoxinen ist jedoch nicht mög-

lich. Für eine therapeutische Anwendung, wie sie beispielsweise für die Gentherapie vorgesehen ist, werden jedoch Nucleinsäure-Präparationen mit noch höherer Reinheit benötigt, die möglichst frei von allen Verunreinigungen (insbesondere weitestgehend frei von Endotoxinen) sind. Vor allem der Endotoxingehalt von Plasmid-DNA-Präparationen stellt bisher ein nicht gelöstes Problem dar, wie beispielsweise von Cotten et al., Gene Therapy 1 (1994) 239 - 246 beschrieben wurde.

- 10 K.-G. Wahlund und A. Litzén (Journal of Chromatography, 461 (1989), 73-87; 476 (1989), 413-421) beschreiben ein als "Field Flow Fractionation" (FFF) bezeichnetes für analytische und mikropräparative Anwendungen geeignetes Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen und Plasmiden entsprechend dem je-
15 weiligen Molekulargewicht. Die Ultrafiltrationsmembran wird wie bei einer Cross-Flow-Filtration tangential angeströmt, jedoch basiert die Trennung im Unterschied zur Cross-Flow-Filtration auf der unterschiedlichen Migration der Moleküle im Trägerfluidstrom. Die zu trennenden Moleküle eluieren somit in
20 Abhängigkeit ihrer Molekülgröße und dem damit korrelierenden Diffusionskoeffizienten. Die Trennung erfolgt nicht kontinuierlich, d.h. die aufzutrennenden Moleküle überströmen die Membran während des Trennvorgangs nur ein einziges Mal.
- 25 F.M. Fernandez, J.M. Romano und M.A. Otero (Acta Biotechnol. 12 (1992) 1, 49-56) beschreiben die Konzentrierung von RNA in Lösung in einem Cross-Flow-Filtrationsverfahren mit Hohlfasermembranen. Die Reinigung von DNA oder Plasmid-DNA wird jedoch weder beschrieben noch nahegelegt.
- 30 G.W. Rembhotkar und G.S. Khatri (Analytical Biochemistry, 176, 337-374 (1989)) beschreiben die Reinigung von λ -Phagenlysat mittels "Tangential Flow Filtration". Eine daran anschließende λ -Phagen DNA Präparation erfolgt mit gebräuchlichen Me-
35 thoden unter Verwendung von Chlorophorm, Phenol-Chlorophorm-Behandlung und Ethanol-Präzipitation.

In WO96/36706 und 96/02658 A1 wird ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismen beschrieben, die im großtechnischen Maßstab hergestellt wurden. Die Zellen werden durch Zugabe einer Lyselösung und Erhitzen auf 70°C bis 100°C in einem Durchflußwärmetauscher aufgeschlossen und anschließend wird ein klarer Zellüberstand durch chargenweise Zentrifugation und Diafiltration erhalten. Die Diafiltration erfolgt dabei im "Dead-End-Modus", jedoch nicht durch tangentialen Überströmen der Membran entsprechend einem Cross-Flow-Fraktionsverfahren. Danach erfolgt eine weitere Reinigung über Anionenaustauscherchromatographie und Reversed Phase HPLC. In diesem Verfahren wird lediglich der Zellaufschluß in einem kontinuierlichen Verfahrensschritt durchgeführt, die weitere Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt chargenweise in gebräuchlichen Zentrifugen und Diafiltrationsvorrichtungen.

In EP-A 96 101 628.4 wird vorgeschlagen, Nucleinsäure-Präparationen über Anionenaustauscher mittels eines Hochsalzgradienten zu reinigen, um Nucleinsäure-Lösungen zu erhalten, die einen Proteingehalt von weniger als 0,1 % haben, frei von Verunreinigungen, wie etwa Ethidiumbromid, Phenol, Cäsiumchlorid und Detergenzien sind und die weitgehend frei von Endotoxinen sind.

25

Aus dem Stand der Technik sind somit weder Verfahren bekannt, die es ermöglichen große Nucleinsäuremengen zu reinigen oder zu konzentrieren, noch sind Verfahren bekannt, mit denen Nucleinsäuren in großen Mengen und in hochreiner Form, insbesondere frei von Endotoxinen, die für eine therapeutische Verwendung geeignet sind, bereitzustellen.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe war es daher, ein Reinigungs- und Konzentrationsverfahren bereitzustellen, das es auf einfache Weise ermöglicht, Nucleinsäuren in großen Mengen aufzureinigen. Eine weitere der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, die Konzen-

tration an Endotoxinen in einer Nucleinsäure-Präparation soweit zu reduzieren, daß sie für den therapeutischen Einsatz geeignet ist.

5 In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Nucleinsäure enthaltende Lösung tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeigeleitet
10 wird, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können, wobei eine gereinigte oder/und konzentrierte Nucleinsäure-Lösung erhalten wird.

15

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Nucleinsäure enthaltende Präparation tangential an
20 einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeigeleitet wird, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können oder/und von der Membran adsorbiert werden, wobei eine im wesentlichen
25 endotoxinfreie Nucleinsäure-Lösung erhalten wird.

Es wurde nun festgestellt, daß sich mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung unter Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage Nucleinsäure-Lösungen reinigen und konzentrieren lassen. Überraschend und neu ist dabei insbesondere, daß
30 die Nucleinsäuren durch die Cross-Flow-Filtration (CFF) nicht geschädigt werden. Man ging bisher immer davon aus, daß die bei der CFF auftretenden Scherkräfte zu Schädigungen von Nucleinsäuren, insbesondere zu Strangbrüchen führen würden.
35 Deshalb wurde die CFF bisher nur zur Konzentrierung und Diafiltration von Proteinen eingesetzt. Außerdem können mit dem Verfahren der Erfindung nicht nur Nucleinsäuren in großen Men-

gen und gewünschter Reinheit erhalten werden, sondern das Verfahren der vorliegenden Erfindung vermeidet auch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, was in toxikologischer Hinsicht sowie unter Sicherheits- und Umweltaspekten von großem Vorteil ist.

Überraschenderweise wurde darüber hinaus festgestellt, daß mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung auch Nucleinsäure-Präparationen gewonnen werden können, die weitgehend von Verunreinigungen, insbesondere von Endotoxinen, befreit sind, so daß sie in therapeutischen Verfahren oder Anwendungen eingesetzt werden können. Damit löst das vorliegende Verfahren ein Problem, das durch den stark steigenden Mengenbedarf an therapeutisch einsetzbaren Nucleinsäuren, insbesondere an therapeutisch einsetzbarer DNA entstanden ist und erwartungsgemäß in Zukunft weiter ansteigen wird.

Mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung werden lineare oder zirkuläre Nucleinsäuren, vorzugsweise Plasmid-DNA und am meisten bevorzugt zirkuläre Plasmid-DNA gereinigt oder/und konzentriert. Die Größe der Nucleinsäure liegt dabei vorzugsweise im Bereich von ≥ 150 Basenpaaren, besonders bevorzugt im Bereich von 1 kbp - 200 kbp. Die Nucleinsäure kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren chargenweise gereinigt oder/und konzentriert werden, vorzugsweise wird das Verfahren kontinuierlich durchgeführt. Jede Volumengröße kann prozessiert werden, wobei vorzugsweise eine Lösung mit einem Volumen von 1 bis 10.000 l, besonders bevorzugt mit 1 - 100 l aufgearbeitet wird. Die die Nucleinsäuren enthaltende Lösung wird unter geeigneten Druckbedingungen an der oder den Membranen vorbeigeleitet, wobei der Überströmdruck vorzugsweise größer als der Transmembrandruck ist. Besonders bevorzugt wird unter einem Transmembrandruck von 0,2 bis 3,0 bar, am meisten bevorzugt von 0,8 - 1,5 bar gearbeitet, wobei der Überströmdruck größer als der Transmembrandruck ist. Die Retentatfließrate (RF) kann über einen weiten Bereich variiert werden, vorzugsweise wird mit einer RF von 100 l/h·m² bis 4.000 l/h·m² gearbeitet. Das

Verfahren kann auch bei variierenden Temperaturen durchgeführt werden, vorzugsweise wird in einem Temperaturbereich von 4° C - 25° C gearbeitet.

- 5 Um die Nucleinsäuren enthaltende Lösung von niedermolekularen Verunreinigungen und insbesondere von Endotoxinen zu trennen, werden gebräuchliche Membranen, wie etwa Membranen aus Polyethersulfon (PES) modifiziertem PES, Polyvinylidendifluorid (PVDF), Cellulosetriacetat oder regenerierter Cellulose ver-
- 10 wendet. Ebenfalls für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind Hohlfaserwickelmodule. Vorzugsweise werden Membranen mit einer Ausschlußgröße von 1 - 1000 Kilodalton (kD), mehr bevorzugt von 10 - 300 kD und am meisten bevorzugt von 10 - 100 kD, verwendet. Der Endotoxinabreicherungsfaktor (Endotoxingehalt
- 15 der Nucleinsäure-Präparation vor Cross-Flow-Filtration zu Endotoxingehalt der Nucleinsäure-Lösung nach Cross-Flow-Filtration), der in dem vorliegenden Verfahren erreicht wird, beträgt dabei mindestens 10 : 1, vorzugsweise mindestens 200 : 1. Der Endotoxingehalt der Lösung ist nach der Cross-Flow-
- 20 Filtration sehr gering, er beträgt vorzugsweise < 0,1 EU/mg Nucleinsäure. Die in dem vorliegenden Verfahren erhaltenen Nucleinsäuren sind im wesentlichen unbeschädigt und weisen im wesentlichen keine Einzel- oder Doppelstrangbrüche auf.
- 25 Insbesondere zeigt eine erfindungsgemäß gereinigte Plasmid-DNA nach gelektrophoretischer Auftrennung nur eine dominante Bande, die der Konformation "Covalently Closed Circle" entspricht. Des weiteren sind neben geringen Anteilen der Konformationen "Open Circle" und "Linearized Circle" keine wei-
- 30 teren Banden vorhanden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer

35 Lösung.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfin-

5 dung die Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur
Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation.

 In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorhergehende Er-
5 findung die Verwendung der mit der Cross-Flow-Filtration ge-
 reinigten oder/und konzentrierten Nucleinsäuren zum Klonieren,
 zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in
 Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Gentherapie, der DNA-
 Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

10

Beispiele

 In den beschriebenen Versuchen wurden Membranen des Typs "OME-
 GA" aus modifiziertem Polyethersulfon der Firma Filtron (Best-
15 Nr. δ S 100CO1 Ausschlußgrenze 100 kD), Membranen aus Cellulo-
 seacetat der Firma Sartorius oder PVDF Membranen der Firma
 Millipore verwendet. Insbesondere zur Endotoxinabtrennung
 wurde eine Membran mit der Ausschlußgrenze von 100 Kilodalton
 verwendet. Zur Überprüfung der Abtrennung von Endotoxinen
20 wurden als Aufstocklösung E-Toxate® der Firma Sigma (Bestell-
 Nr.: 210) verwendet. Die Prüfung auf Endotoxine erfolgte nach
 der "Festgel-Methode", in der die Zugabe einer endotoxinhalti-
 gen Lösung zu einer Limulus-Amöbozyten-Lysat-Lösung (LAL-Lö-
 sung) eine Gelbildung des Gemisches verursacht. Der Gelbildung
25 liegt eine in mehreren Schritten ablaufende Gerinnungskaskade
 zugrunde.

1. Cross-Flow-Filtration (CFF) einer Plasmid-DNA-Lösung

30 Zur Überprüfung der CFF als Methode zur Konzentrierung von
 Plasmid-DNA wird ein Produktionsansatz von 2.000 g E.coli-
 Biomasse durch eine Alkali-Lyse aufgeschlossen, über Q-Sepha-
 rose und Hydroxylapatit-Chromatographie prozessiert, und die
 erhaltene Plasmid-DNA-Lösung als Ausgangslösung in die CFF
35 eingesetzt.

1.1. Herstellung einer Ausgangslösung

2.000 g feuchte E.coli Biomasse wird aus dem Fermenter in entpyrogenisierte Zentrifugenbecher abgefüllt. Es werden 22,5 l Resuspensionspuffer (50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l EDTA- Na_2 , pH $8 \pm 0,2$) zugegeben und mindestens 24 Stunden bei $5 \pm 4^\circ \text{C}$ langsam (ca. 35 RPM) gerührt, bis die Biomasse vollständig suspendiert ist. Dabei wird die Temperatur der Suspension langsam auf 25°C erhöht.

10

Zur Suspension werden 22,5 l 0,2 mol/l NaOH, 1 % SDS unter Rühren mit ca. 80 RPM zugegeben und bei 25°C 5 Minuten inkubiert. Es werden 22,5 l Kaliumacetatpuffer (3 mol/l Kaliumacetatpuffer pH 5,5) unter Rühren zugefügt und die Temperatur der Biomasse möglichst schnell auf 4°C abgesenkt. Die Biomasse wird für 30 Minuten bei 26.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird isoliert und über eine 5 μm Filterkerze klarfiltriert.

20 Im nächsten Schritt wird eine Chromatographie an Q-Sepharose durchgeführt. Der dekantierte Zentrifugenüberstand wird durch Zugabe von TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA pH $8,5 \pm 0,2$) auf 49 - 50 mS/cm Leitfähigkeit eingestellt und auf $5 \pm 4^\circ \text{C}$ abgekühlt. Die gesamte Chromatographie wird bei dieser 25 Temperatur durchgeführt. Der Zentrifugationsüberstand wird auf die aquilibrierte Säule aufgezogen. Anschließend wird die Säule mit ca. 8 SV 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mol/l NaCl pH $8,5 \pm 0,2$ gewaschen.

30 Zur Elution wird an die Säule ein Gradient (5 SV Puffer A (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mmol/l NaCl pH $8,0 \pm 2$), 5 SV Puffer B (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,85 mol/l NaCl pH $8,0 \pm 0,2$)) angelegt und das Eluat bei einer Flußrate von 5 bis 8 SV/h fraktioniert, die Detektion erfolgt bei 254 35 nm. Der Vorpeak (Verunreinigungen) wird vom Hauptpeak (Plasmid-DNA) abgetrennt, in dem der Hauptpeak ab ansteigender Flanke in einem separaten Gefäß aufgefangen wird.

Anschließend wird eine Chromatographie an Hydroxylapatit (HA Ceramic) bei $5 \pm 4^\circ \text{C}$ durchgeführt.

Äquilibrierungspuffer: 0,1 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH 7, $0 \pm 0,2$.

Waschpuffer 1: 0,15 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$.

10 Waschpuffer 2: 0,02 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH $7,0 \pm 0,2$.

Elutionspuffer: 0,5 mol/l Kaliumphosphat pH $7,0 \pm 0,2$.

Die Detektion erfolgt bei 254 nm mit einer UV-Detektor/Schreibereinheit. Als Eichlösung wird eine 1 % Produktlösung (Plasmid-DNA), vermessen mit einem kalibrierten Photometer verwendet.

Der Q-Sepharose-Pool wird auf eine Endkonzentration von 1,1 mmol/l Calciumchlorid gebracht und auf die äquilibrierte Säule aufgezogen.

Dann wird die Säule bei einer Flußrate von 5-8 SV/h nacheinander gewaschen mit:

25

1. 0,1 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$, bis am Detektor keine Absorption mehr erkennbar ist.
2. 2-4 SV, 0,15 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$.
- 30 3. 5 SV, 0,02 mol/l Kaliumphosphat pH $7,0 \pm 0,2$.

Im Anschluß an die Waschschriffe wird mit 0,5 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH $7,0 \pm 0,1$ eluiert. Der Peak wird gesammelt und als Plasmid-DNA-Ausgangslösung in die CFF eingesetzt.

35

1.2 Cross-Flow-Filtration

Die Plasmid-DNA-Ausgangslösung hat eine Plasmid-DNA-Konzentration von ca. 200 µg/ml und ein Volumen von ca. 3750 ml. Die CFF wird mit einer Retentatdurchflußrate von 100-200 l/h•m², einem Transmembrandruck von ca. 0,8 bar und einem Überström-
druck von ca. 1,2 bar durchgeführt. Mit Hilfe der CFF wird das
Volumen auf ca. 50 ml konzentriert und das Retentat anschlie-
ßend gegen TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH
8,0) fließend diafiltriert, bis die Werte für pH und Leitfä-
higkeit von Retentat und TE-Puffer übereinstimmen. Nach Been-
10 digung des Diafiltrationsvorganges wird das Retentat durch
Verdünnung mit Diafiltrationspuffer auf eine Plasmid-DNA-Kon-
zentration von 1 mg/ml eingestellt. Eine Probe der erstellten
Plasmid-DNA-Lösung wird entnommen und diese wie unter Punkt
3.1 beschrieben analysiert.

15

2. Messung der Endotoxinanreicherung nach CFF

Eine Plasmid-DNA-Lösung mit einem Volumen von 100 ml wird mit
1000 EU der E-Toxate® Endotoxinstandardlösung auf 10 EU/ml
20 aufgestockt und darauf als Ausgangslösung im Experiment ein-
gesetzt. Die Lösung wird mit TE-Puffer auf 1000 ml verdünnt
und dann mit Hilfe der CFF wieder auf das Ausgangsvolumen von
100 ml konzentriert (Konzentrat 1). Der Verdünnungs- und Kon-
zentrierungsschritt wird viermal hintereinander wiederholt.
25 Nach jedem Konzentrierungsschritt wird aus dem jeweiligen
Konzentrat eine Probe entnommen (Proben: Konzentrat 2, 3, 4,
5) und die Endotoxinkonzentration der Probe mit dem Limulus-
Amöbozyten-Lysat Verfahren analysiert.

30 3. Ergebnisse

3.1 CFF der Plasmid-DNA-Lösung

Die Plasmid-DNA-Lösung läßt sich mit Hilfe der CFF problemlos
35 konzentrieren und diafiltrieren. Die Ergebnisse der Untersu-
chung sind in nachfolgender Tabelle zusammengefaßt.

Parameter	PLASMID-DNA-Ausgangslösung (HA-Pool)	PLASMID-DNA nach CFF	Diafiltrationspuffer (TE): 10 mmol/l Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0
Volumen (ml)	3750	505	-
OD _{260/280}	1.89	1.90	-
Leitfähigkeit (mS/cm)	26.5	1.11	1.11
pH	6.99	7.93	7.98
Ausbeute (mg)	763	666	-

Ein Aliquot der Plasmid-DNA nach erfolgter CFF wird in verschiedenen Konzentrationen auf ein Agarosegel aufgetragen. Das dargestellte Agarosegel zeigt in den Spuren 1 und 10 den DNA Längenstandard Nr. II (Fragmentgrößen: 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 bp) und in den Spuren 2 und 9 DNA Längenstandard Nr. III (Fragmentgrößen: 125, 564, 831, 647, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 bp). Als Vergleichsplasmid ist in Spur 3 pBR322 (4162bp) aufgetragen, das nach konventioneller Cäsiumchloridgradientenmethode aufgereinigt wurde. Es ist bekannt, daß nach dieser Methode gereinigte Plasmid-DNA im wesentlichen Plasmid-DNA enthält, die der Konformation "Covalently Closed Circle" (dominante "Supercoiled-Bande") entspricht. In den Spuren 4, 5 und 6 ist die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgereinigte Plasmid-DNA (pCMV-CAT) in unterschiedlichen Mengen aufgetragen. Die erfindungsgemäß gereinigte Plasmid-DNA zeigt wie auch die Vergleichsplasmid-DNA (Spur 3) im wesentlichen eine dominante Bande. Diese Plasmid-DNA-Bande entspricht der Konformation "Covalently Closed Circle" (dominante "Supercoiled-Bande"). Dies zeigt, daß die erfindungsgemäß gewonnene Plasmid-DNA nicht geschädigt wird und in ihrer ursprünglichen Konformation erhalten bleibt. Somit kann ausgeschlossen werden, daß die Plasmid-DNA während der CFF fragmentiert oder in eine unerwünschte Plasmid-DNA-Konformation überführt wird.

Legende:

1%iges Agarosegel

- Spur 1: DNA-Längenstandard II (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 236250)
- Spur 2: DNA-Längenstandard III (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 528552)
- Spur 3: pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 481238) (0,4 μ g)
- Spur 4: pCMV-CAT nach CFF, 0,19 μ g (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 5: pCMV-CAT nach CFF, 0,45 μ g (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 6: pCMV-CAT nach CFF, 0,71 μ g (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 7: TE-Puffer
- Spur 8: pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 481238) (0,4 μ g)
- Spur 9: DNA-Längenstandard III (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 528552)
- Spur 10: DNA-Längenstandard II (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 236250)

3.2 Endotoxinanreicherung durch CFF

Die folgende Tabelle zeigt, daß die Endotoxine bereits nach dem ersten Konzentrierungsschritt weitgehend abgereinigt sind.
5 Die weitere CFF reduziert die Endotoxinkonzentration bis zur Nachweisgrenze der Testmethode.

Probe	Retentatvolumen [ml]	Gemessene Endotoxinkon- zentration im Retentat [EU/ml]
Ausgangslösung	100	6-12
10 Konzentrat 1	100	0,06-0,60
Konzentrat 2	100	0,06-0,60
Konzentrat 3	100	0,06-0,60
Konzentrat 4	100	0,06-0,60
Konzentrat 5	100	< 0,06
15 Diafiltrationspuffer	-	< 0,06

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von
5 Nucleinsäuren in einer Lösung,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nucleinsäure enthaltende Lösung tangential an
einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeige-
leitet wird, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den
10 Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem
geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durch-
treten können, wobei eine gereinigte oder/und konzen-
trierte Nucleinsäure-Lösung erhalten wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nucleinsäure Plasmid-DNA ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
daß die Nucleinsäure eine Größe von ≥ 150 Basenpaaren
hat.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
daß das Verfahren kontinuierlich durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß eine Lösung mit einem Volumen von 1 - 10.000 l aufge-
arbeitet wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
35 daß eine Lösung mit einem Volumen von 1 - 100 l aufge-
arbeitet wird.

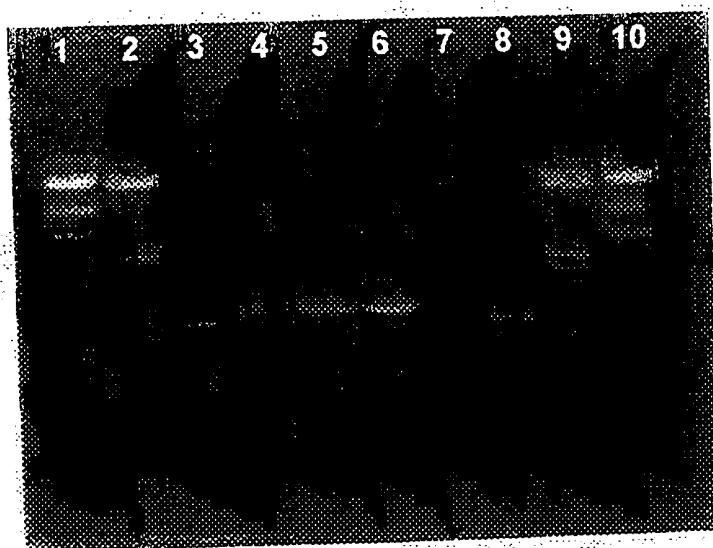
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Lösung unter Druck an der/den Membran(en) vorbeigeleitet wird, wobei der Überströmdruck größer als der Transmembrandruck ist.
5
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß unter einem Transmembrandruck von 0,2 - 3,0 bar gearbeitet wird.
10
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß mit einer Retentatfließrate von 100 - 4.000 l/h•m² gearbeitet wird.
15
10. Verfahren zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß die Nucleinsäure enthaltende Präparation tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeigeleitet wird, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durch-
25 treten können oder/und von der Membran adsorbiert werden, wobei eine im wesentlichen endotoxinfreie Nucleinsäure-Lösung erhalten wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10,
30 dadurch gekennzeichnet,
daß die Membran(en) eine Ausschlußgröße von 1 - 1000 kD hat/haben.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10
35 dadurch gekennzeichnet,
daß die Membran(en) eine Ausschlußgröße von 10 - 100 kD hat/haben.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Verfahren kontinuierlich durchgeführt wird.
- 5 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Präparation mit einem Volumen von 1 - 10.000 l,
vorzugsweise 1 - 100 l aufgearbeitet wird.
- 10 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Endotoxinanreicherungsfaktor, Endotoxingehalt der
Präparation vor der Cross-Flow-Filtration (CFF) zu Endo-
toxingehalt der Lösung nach der CFF mindestens 10 : 1
15 beträgt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Endotoxinanreicherungsfaktor mindestens 200 : 1
20 beträgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Endotoxingehalt der Lösung nach der Cross-Flow-
25 Filtration < 0,1 EU/mg Nucleinsäure aufweist.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erhaltene Nucleinsäure im wesentlichen keine
30 Strangbrüche aufweist.
19. Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reini-
gung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in
einer Lösung.
- 35 20. Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Ab-
trennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präpara-

tion.

21. Verwendung der nach einem der vorhergehenden Ansprüche
gereinigten oder/und konzentrierten Nucleinsäuren zum
s Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mi-
kroinjektion in Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der
Gentherapie, der DNA-Vakzinierung oder/und zur Polyme-
rase-Ketten-Reaktion (PCR).

Abbildung 1



(12) PATENT
(19) AUSTRALIAN PATENT OFFICE

(11) Application No. AU 199862084 B2
(10) Patent No. 723817

(54) Title
Purification and/or concentration of DNA by cross-flow filtration

(51)⁷ International Patent Classification(s)
C12N 015/10 C07H 001/08
B01D 021/26

(21) Application No: 199862084

(22) Application Date: 1998.01.09

(87) WIPO No: WO98/30685

(30) Priority Data

(31) Number	(32) Date	(33) Country
97100331	1997.01.10	EP

(43) Publication Date : 1998.08.03

(43) Publication Journal Date : 1998.09.24

(44) Accepted Journal Date : 2000.09.07

(71) Applicant(s)
Roche Diagnostics GmbH


(72) Inventor(s)
Wolfgang Kuhne

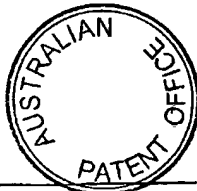
(74) Agent/Attorney
DAVIES COLLISON CAVE,GPO Box 3876,SYDNEY NSW 2001

THIS PAGE BLANK (USPTO)



AU9862084

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/10, C07H 1/08, B01D 21/26		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/30685
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	16. Juli 1998 (16.07.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00103		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Januar 1998 (09.01.98)			
(30) Prioritätsdaten: 97100331.4 10. Januar 1997 (10.01.97) EP			
(34) Länder für die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.			
<i>See folios 3 & 4.</i> ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE/DE); Sandhofer Strasse 412-432, D-68305 Mannheim, (DE). 116, D-68305 Mannheim, Germany		Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts. 	
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUHNE, Wolfgang [DE/DE]; Wolfbauerweg 10, D-82377 Penzberg (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			
(54) Title: PURIFICATION AND/OR CONCENTRATION OF DNA BY CROSS-FLOW FILTRATION, SEPARATION OF ENDO-TOXINS FROM A NUCLEIC ACID PREPARATION			
(54) Bezeichnung: REINIGUNG ODER/UND KONZENTRIERUNG VON DNA DURCH CROSS-FLOW-FILTRATION. ABTRENNUNG VON ENDOTOXINEN AUS EINER NUCLEINSÄURE-PRÄPARATION			
(57) Abstract <p>The invention concerns a method of purifying and/or concentrating nucleic acids in a solution, the solution containing nucleic acid being guided tangentially past one or a plurality of semipermeable membranes, such that the nucleic acid molecules are retained by the membranes and substances having a lower molecular weight can pass through the membranes and/or be adsorbed thereat, so that a purified and/or concentrated nucleic acid solution is obtained. The same method is carried out to separate endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention further concerns the use of a cross-flow filtration system for purifying and/or concentrating nucleic acids in a solution and for separating endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention also concerns the use of the nucleic acids purified and/or concentrated by the cross-flow filtration system for cloning, transformation, transfection and microinjection into cells, for use in gene therapy processes, DNA vaccination and/or for polymerase chain reaction (PCR).</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung, wobei man die Nucleinsäure enthaltende Lösung tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeileitet, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können oder/und an der Membran adsorbiert werden und man eine gereinigte oder/und konzentrierte Nucleinsäure-Lösung erhält. In derselben Weise wird zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation verfahren. Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung sowie zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation. Ferner die Verwendung der mit der Cross-Flow-Filtration gereinigten oder/und konzentrierten Nucleinsäuren zum Klonieren, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Genterapie, der DNA-Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).</p>			



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abstract

The invention concerns a method for purifying or/and concentrating nucleic acids in a solution, the solution containing nucleic acid being guided tangentially past over one or several semipermeable membranes such that the nucleic acid molecules are retained by the membranes and substances with a lower molecular weight can pass through the membranes or/and are adsorbed to the membrane to obtain a purified and/or concentrated nucleic acid solution. The same method is carried out to separate endotoxins from a nucleic acid preparation. In addition the invention concerns the use of a cross-flow filtration system to purify or/and concentrate nucleic acids in a solution and to separate endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention also concerns the use of the nucleic acids purified and/or concentrated by cross-flow filtration for cloning, for transformation, for transfection, for microinjection into cells, for use in gene therapy methods, DNA vaccination or/and for the polymerase chain reaction (PCR).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PURIFICATION OR/AND CONCENTRATION OF DNA BY CROSS-FLOW
FILTRATION

Description

The present invention concerns a method for purifying or/and concentrating nucleic acids in a solution,

Nucleic acid purification methods are common methods in the field of molecular biology. In methods known from the prior art the isolated biological material, such as E. coli bacterial cells is for example centrifuged after they have been lysed (usually lysis with lysozyme or ultrasound) and the supernatant is shaken out with phenol. Subsequently an ultracentrifugation is carried out on a caesium chloride gradient (Birnboim & Doly, Nucl. Acid Res. 7 (1979) 1513-1523; Garger et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 117 (1983) 835-842).



THIS PAGE BLANK (USPTO)

for the toxic effect of endotoxins.

Another method for purifying nucleic acids is described in the QIAGEN® Plasmid Handbook (Qiagen Inc., Chatsworth, USA) and in EP-B 0 268 946. According to this the cell lysate obtained by the usual lysis is chromatographed on a QIAGEN® TIP which contains QIAGEN® resin (a support material based on silica gel). A disadvantage of this method is that DNA binding proteins are not completely detached from the DNA so that the plasmid preparation that is obtained contains a considerable amount of proteins and in particular endotoxins (e.g. from the membrane of the E. coli cell).

In another nucleic acid purification method after alkaline lysis of the biological material for example E. coli cells the centrifugation supernatant is chromatographed according to Birnboim & Doly under high salt conditions over anion exchange columns (e.g. Mono-Q, Source-Q from Pharmacia, Macrorep-Q from Biorad, Poros-Q from Perspective Biosystems or HyperD-Q from Biosepra, cf. Chandra et al., *Analyt. Biochem.* 203 (1992) 169-172; Dion et al., *J.Chrom.* 535 (1990) 127-147). Even after this purification step the plasmid preparation still contains impurities such as proteins and especially a considerable amount of endotoxins.

In yet another method for purifying nucleic acids a chromatography is carried out by gel filtration after alkaline lysis and subsequent phenol-chloroform extraction (McClung & Gonzales, *Anal.Biochem.* 177 (1989) 378-382; Raymond et al., *Analyt.Biochem.* 173 (1988) 124-133). This purification method is also not able to completely remove the impurities from the plasmid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

preparation.

The said purification methods all have a final desalting and concentration step. This usually involves an isopropanol/ethanol precipitation of the nucleic acid with subsequent centrifugation and resuspension of the nucleic acid pellet in buffer (cf. e.g. Sambrook J. et al. (1989), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press). In this process a DNA solution is for example admixed with 1/10 volumes 4 M LiCl and subsequent with 0.7 volumes isopropanol at room temperature. Subsequently the precipitate that forms of the nucleic acid is centrifuged and the supernatant is discarded. The pellet which contains the nucleic acid is taken up in 70 % ethanol in a subsequent step, centrifuged again, the supernatant is discarded and, after drying the pellet, it is resuspended in a desired buffer. However, the isopropanol/ethanol precipitation method is only practical for applications in a laboratory where relatively small volumes are used.

Apart from the limitation to small volumes, the described isopropanol/ethanol precipitation method has other serious disadvantages. Thus for reasons of operational safety and environmental protection it is very unfavourable to use the required isopropanol/ethanol volumes on an industrial process scale.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

A method for isolating and purifying nucleic acids for use in gene therapy is described in WO 95/21177 in which the purification is essentially by centrifugation, filtration, an affinity chromatography or a chromatography on an inorganic chromatographic material and a chromatography on an ion exchanger. In order to remove endotoxins the nucleic acid is treated with an endotoxin removal buffer which contains 10 % Triton® X100 and 40 mmol/l MOPS buffer (3-morpholino-1-propane sulfonate). A disadvantage of this method is that the nucleic acid purified in this manner is contaminated with the pharmacologically unsafe substances Triton® and MOPS. In addition, although it is possible to deplete endotoxins to a content of ca. 100 EU/mg DNA (QIAGEN News 1-96, 3-5), a more extensive removal of endotoxins is not possible. However, nucleic acid preparations with an even higher purity are required for a therapeutic application, like for example a gene therapy, which are as free as possible of all impurities (in particular substantially free of endotoxins). Above all the endotoxin content of plasmid DNA preparations has been a hitherto unsolved problem as for example described by Cotten et al., Gene Therapy 1 (1994) 239 - 246.

K.-G.Wahlund and A. Litzén (Journal of Chromatography, 461 (1989), 73-87; 476 (1989), 413-421) describe a method named "field flow fractionation (FFF)" suitable for analytical and micropreparative applications for separating protein mixtures and plasmids according to their respective molecular weights. As in a cross-flow filtration the approach flow on the ultrafiltration membrane is tangential but, in contrast to cross-flow filtration, the separation is based on the different migration of the molecules in the stream of carrier fluid. Hence the elution of the molecules to be

THIS PAGE BLANK (USPTO)

separated depends on their molecular size and the correlating diffusion coefficients. The separation is not continuous i.e. the molecules to be separated flow over the membrane only once during the separation process.

F.M. Fernandez, J.M. Romano and M.A. Otero (Acta Biotechnol. 12 (1992) 1, 49-56) describe the concentration of RNA in solution in a cross-flow filtration method with hollow fibre membranes. However, the purification of DNA or plasmid DNA is neither described nor made obvious.

G.W. Rembhotkar and G.S. Khatri (Analytical Biochemistry, 176, 337-374 (1989)) describe the purification of a λ phage lysate by means of tangential flow filtration. A subsequent λ phage DNA preparation is carried out with common methods using chloroform, phenol-chloroform treatment and ethanol precipitation.

A method for the isolation and purification of plasmid DNA from microorganisms is described in WO 96/36706 and 96/02658 A1 which were produced on a large scale. The cells are lysed by adding a lysis solution and heating to 70°C to 100°C in a flow heat exchanger and subsequently a clear supernatant is obtained by batch-wise centrifugation and diafiltration. The diafiltration is carried out in the dead-end modus but not by tangential overflow of the membrane according to a cross-flow fraction method. Afterwards a further purification is carried out by anion exchange chromatography and reversed phase HPLC. In this method only the cell lysis is carried out in a continuous process step, the further purification of the plasmid DNA is carried out in a batch

THIS PAGE BLANK (USPTO)

manner in common centrifuges and diafiltration devices.

In EP-A 96 101 628.4 the purification of nucleic acid preparations by an anion exchanger using a high salt gradient is suggested in order to obtain nucleic acid solutions which have a protein content of less than 0.1%, are free of impurities such as ethidium bromide, phenol, caesium chloride and detergents.

Hence in the prior art methods are not known which would enable large amounts of nucleic acids to be purified or concentrated.

10

The present invention concerns a method for purifying and/or concentrating plasmid DNA in solution wherein the solution containing the plasmid DNA is guided tangentially past one or several semi-permeable membranes such that the plasmid DNA molecules are retained by the membranes and substances with a lower molecular weight can pass through

20

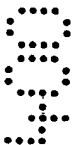
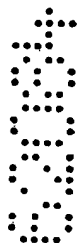
25



THIS PAGE BLANK (USPTO)

the membranes to obtain a purified or/and concentrated plasmid DNA solution.

It has now been found that nucleic acid solutions can be purified and concentrated with the method of the present invention using a cross-flow filtration system. In this connection a surprising and new feature is that the nucleic acids are not damaged by the cross-flow filtration (CFF). Previously it has always been assumed that the shear forces occurring in the CFF would lead to damage of nucleic acids in particular to strand breaks. Therefore CFF was previously only used to concentrate and diafiltrate proteins. In addition the method of the invention not only enables nucleic acids to be obtained in large amounts and of a desired purity, but the method of the present invention also avoids the use of organic solvents which is a major advantage toxicologically as well as with regard to safety and environmental aspects.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

The method of the present invention is used to purify or/and concentrate linear or circular nucleic acids, preferably plasmid DNA and most preferably circular plasmid DNA. In this connection the size of the nucleic acid is preferably in the range of ≥ 150 base pairs, particularly preferably in the range of 1 kbp - 200 kbp. In the method according to the invention the nucleic acid can be purified or/and concentrated batch-wise but the method is preferably carried out continuously. Any volume size can be processed but it is preferable to process a solution with a volume of 1 to 10,000 l, particularly preferably of 1 - 100 l. The solution containing the nucleic acids is guided past the membrane or membranes under suitable pressure conditions whereby the cross-flow pressure is preferably larger than the transmembrane pressure. It is particularly preferable to operate at a transmembrane pressure of 0.2 to 3.0 bar and most preferably of 0.8 - 1.5 bar in which case the cross-flow pressure is larger than the transmembrane pressure. The retentate flow rate (RF) can be varied over a wide range and it is preferably to operate with an RF of 100 l/h·m² to 4,000 l/h·m². The process can also be carried out at varying temperatures and it is preferable to work in a temperature range of 4°C - 25°C.

In order to separate the solution containing nucleic acids from low molecular impurities and in particular from endotoxins, common membranes are used such as



THIS PAGE BLANK (USPTO)

membranes made of polyether sulfone (PES), modified PES, polyvinylidene difluoride (PVDF), cellulose triacetate or regenerated cellulose. Hollow fibre coil modules are also suitable for the method according to the invention. Membranes with an exclusion size of 1 - 1000 kilodalton (kD) are preferably used, 10 - 300 kD is more preferred and 10 - 100 kD is most preferred. The endotoxin depletion factor (ratio of endotoxin content of the nucleic acid preparation before cross-flow filtration to the endotoxin content of the nucleic acid solution after cross-flow filtration) that is achieved in the present invention is at least 10 : 1, preferably at least 200 : 1. The endotoxin content of the solution is very low after cross-flow filtration and is preferably < 0.1 EU/mg nucleic acid. The nucleic acids obtained in the present invention are essentially undamaged and essentially have no single-strand or double-strand breaks.

In particular a plasmid DNA purified according to the invention exhibits only one dominant band after gel electrophoretic separation which corresponds to the "covalently closed circle" conformation. Furthermore, apart from small amounts of the open circle and linearized circle conformations, no other bands are present.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Examples

In the described experiments membranes of the OMEGA type made of modified polyether sulfone from the Filtron Company (order No. 5S 100C01 exclusion size 100 kD), membranes made of cellulose acetate from the Sartorius Company or PVDF membranes from the Millipore Company were used. A membrane with an exclusion limit of 100 kilodalton was used in particular for endotoxin separation. In order to check the separation of endotoxins, E-toxate[®] from the Sigma Company (order No. 210) was used as a spiking solution. The endotoxins were tested by the solid gel method in which the addition of a solution containing endotoxin to a limulus amoebocyte lysate solution (LAL solution) leads to a gel formation of the mixture. The gel formation is due to a coagulation cascade that occurs in several steps.

1. Cross-flow filtration (CFF) of a plasmid DNA solution

In order to examine CFF as a method for concentrating plasmid DNA, a production preparation of 2000 g E. coli biomass is lysed by alkali lysis, processed by Q-Sepharose and hydroxylapatite chromatography and the plasmid DNA solution that is obtained is used as a starting solution in the CFF.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

1.1 Production of a starting solution

2000 g wet *E. coli* biomass from the fermenter is filled into depyrogenized centrifuge beakers. 22.5 l resuspension buffer (50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l EDTA- Na_2 , pH 8 ± 0.2) is added and slowly stirred (ca. 35 rpm) for at least 24 hours at $5 \pm 4^\circ\text{C}$ until the biomass is completely suspended. In this process the temperature of the suspension is slowly increased to 25°C .

22.5 l 0.2 mol/l NaOH, 1 % SDS is added to the suspension while stirring at ca. 80 rpm and incubated for 5 minutes at 25°C . 22.5 l potassium acetate buffer (3 mol/l potassium acetate buffer pH 5.5) is added while stirring and the temperature of the biomass is reduced as rapidly as possible to 4°C . The biomass is centrifuged for 30 minutes at $26,000 \times g$ and 4°C . The supernatant which contains the plasmid DNA is isolated and filtered clear over a $5 \mu\text{m}$ candle filter.

In the next step a chromatography on Q-Sepharose is carried out. The decanted centrifuge supernatant is adjusted to a conductivity of 49 - 50 mS/cm by addition of TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA pH 8.5 ± 0.2) and cooled to $5 \pm 4^\circ\text{C}$. The entire chromatography is carried out at this temperature. The centrifugation supernatant is absorbed to the equilibrated column. Subsequently the column is washed with ca. 8 CV 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0.65 mol/l NaCl pH 8.5 ± 0.2 .

For the elution a gradient (5 CV buffer A (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0.65 mmol/l NaCl, pH 8.0 ± 2), 5 CV buffer B (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0.85 mol/l NaCl pH 8.0 ± 0.2)) is applied to the column

THIS PAGE BLANK (USPTO)

and the eluate is fractionated at a flow rate of 5 to 8 CV/h, the detection is carried out at 254 nm. The prepeak (impurities) is separated from the main peak (plasmid DNA) by collecting the main peak in a separate vessel starting from the ascending flank.

Subsequently a chromatography on hydroxylapatite (HA ceramic) is carried out at $5 \pm 4^{\circ}\text{C}$.

Equilibration buffer: 0.1 mol/l potassium phosphate, 6 mol/l urea pH 7.0 ± 0.2 .

Wash buffer 1: 0.15 mol/l potassium phosphate, 6 mol/l urea pH 7.0 ± 0.2 .

Wash buffer 2: 0.02 mol/l potassium phosphate buffer pH 7.0 ± 0.2 .

Elution buffer: 0.5 mol/l potassium phosphate pH 7.0 ± 0.2 .

The detection is carried out at 254 nm using a UV detector/recorder unit. A 1 % product solution (plasmid DNA) is used as a calibration solution that was measured with a calibrated photometer.

The Q-Sepharose pool is adjusted to a final concentration of 1.1 mmol/l calcium chloride and absorbed onto the equilibrated column.

Then the column is successively washed at a flow rate of 5-8 CV/h with:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. 0.1 mol/l potassium phosphate, 6 mol/l urea pH 7.0 \pm 0.2 until an absorbance is no longer detectable at the detector.
2. 2-4 CV, 0.15 mol/l potassium phosphate, 6 mol/l urea pH 7.0 \pm 0.2
3. 5 CV, 0.02 mol/l potassium phosphate pH 7.0 \pm 0.2.

It is eluted with 0.5 mol/l potassium phosphate buffer pH 7.0 \pm 0.1 after the wash steps. The peak is collected and used as a plasmid DNA starting solution in the CFF.

1.2 Cross-flow filtration

The plasmid DNA starting solution has a plasmid DNA concentration of ca. 200 μ g/ml and a volume of ca. 3750 ml. The CFF is carried out at a retentate flow rate of 100-200 l/h \cdot m², a transmembrane pressure of ca. 0.8 bar and a cross-flow pressure of ca. 1.2 bar. The volume is concentrated to ca. 50 ml with the aid of the CFF and retentate is subsequently diafiltered against TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0) until the values for pH and conductivity of the retentate and TE buffer agree. After completion of the diafiltration process the retentate is adjusted to a plasmid DNA concentration of 1 mg/ml by dilution with diafiltration buffer. A sample of the prepared plasmid DNA solution is taken and this is analysed as described under item 3.1.

2. Measurement of the endotoxin depletion by CFF

A plasmid DNA solution with a volume of 100 ml is supplemented with 1000 EU of the E-toxate[®] endotoxin standard solution to 10 EU/ml and then used as a starting solution in the experiment. The solution is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

diluted to 1000 ml with TE buffer and then again concentrated with the aid of CFF to its initial volume of 100 ml (concentrate 1). The dilution and concentration step is repeated four times in succession. After each concentration step a sample is taken from each concentrate (samples: concentrate 2, 3, 4, 5) and the endotoxin concentration of the sample is analysed with the limulus-amoebocyte lysate method..

3. Results

3.1 CFF of the plasmid DNA solution

The plasmid DNA solution can be concentrated and diafiltered without difficulty using the CFF. The results of the examination are summarized in the following table.

Parameter	PLASMID DNA initial solution (HA pool)	PLASMID DNA after CFF	Diafiltration buffer (TE): 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0
Volume (ml)	3750	505	-
OD260/280	1.89	1.90	-
Conductivity (mS/cm)	26.5	1.11	1.11
pH	6.99	7.93	7.98
Yield (mg)	763	666	-

An aliquot of the plasmid DNA after completion of the CFF is applied at various concentrations to an agarose gel. The agarose gel that is shown shows the DNA length standard No. II (fragment sizes: 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 bp) in lanes 1 and 10 and the DNA length standard No. III (fragment sizes: 125, 564,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

831, 647, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 bp) in lanes 2 and 9. pBR322 (4162 bp) is applied as a reference plasmid in lane 3 which was purified by a conventional caesium chloride gradient method. It is known that plasmid DNA purified by this method essentially contains plasmid DNA which corresponds to the covalently closed circle conformation (dominant supercoiled band). The plasmid DNA (pCMV-CAT) purified by the method according to the invention is applied in different amounts in lanes 4, 5 and 6. The plasmid DNA purified according to the invention, like the reference plasmid DNA (lane 3), essentially shows a dominant band. This plasmid DNA band corresponds to the covalently closed circle conformation (dominant supercoiled band). This shows that the plasmid DNA isolated according to the invention is not damaged and retains its original conformation. This therefore rules out the possibility that the plasmid DNA is fragmented during the CFF or is converted into an undesired plasmid DNA conformation.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Legend:

1% agarose gel

- Lane 1: DNA length standard II (Boehringer Mannheim GmbH; Cat. No. 236250)
- Lane 2: DNA length standard III (Boehringer Mannheim GmbH, Cat. No. 528552).
- Lane 3: pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH, Cat. No. 481238) (0.4 μ g)
- Lane 4: pCMV-CAT after CFF, 0.19 μ g (bulk active substance solution)
- Lane 5: pCMV-CAT after CFF, 0.45 μ g (bulk active substance solution)
- Lane 6: pCMV-CAT after CFF, 0.71 μ g (bulk active substance solution)
- Lane 7: TE buffer
- Lane 8: pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH, Cat. No. 481238) (0.4 μ g)
- Lane 9: DNA length standard III (Boehringer Mannheim GmbH; Cat. No. 528552)
- Lane 10: DNA length standard II (Boehringer Mannheim GmbH, Cat. No. 236250).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3.2 Endotoxin depletion by CFF

The following table shows that the endotoxins are already substantially removed after the first concentration step. The additional CFF reduces the endotoxin concentration down to the detection limit of the test method.

Sample	Retentate volume [ml]	Measured endotoxin concentration in the retentate [EU/ml]
Initial solution	100	6-12
Concentrate 1	100	0.06 - 0.60
Concentrate 2	100	0.06 - 0.60
Concentrate 3	100	0.06 - 0.60
Concentrate 4	100	0.06 - 0.60
Concentrate 5	100	< 0.06
Diafiltration buffer	-	< 0.06

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The claims defining the invention are as follows:

1. Method for purifying or/and concentrating plasmid DNA in a solution,
wherein
the solution containing plasmid DNA is guided tangentially past one or several semi-permeable membranes in a process that proceeds continuously such that the plasmid DNA molecules are retained by the membranes and substances with a lower molecular weight can pass through the membranes to obtain a purified or/and concentrated plasmid DNA solution.
2. Method as claimed in claim 1,
wherein
the nucleic acid has a size of ≥ 150 base pairs.
3. Method as claimed in one of the previous claims,
wherein
a solution with a volume of 1 - 10,000 l is processed.
4. Method as claimed in one of the previous claims,
wherein
a solution with a volume of 1 - 100 l is processed.
5. Method as claimed in one of the previous claims,
wherein
the solution is guided past the membrane(s) under pressure whereby the cross-flow pressure is larger than the transmembrane pressure.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6. Method as claimed in claim 5,
wherein
a transmembrane pressure of 0.2 - 3.0 bar is used.
7. Method as claimed in one of the previous claims,
wherein
a retentate flow rate of 100 - 4000 l/h•m² is used.
8. Methods for purifying and/or concentrating plasmid DNA in a solution,
substantially as hereinbefore described with reference to the Examples.

DATED this 31st day of March, 2000

ROCHE DIAGNOSTICS GmbH

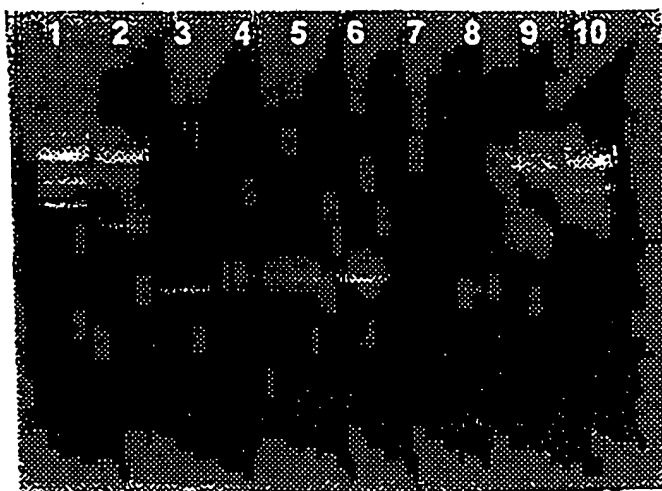
By its Patent Attorneys

DAVIES COLLISON CAVE



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)